

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 59-224565

(43)Date of publication of application : 17.12.1984

(51)Int.Cl.

G01N 33/54
A61K 39/44

(21)Application number : 58-074123

(71)Applicant : MORINAGA MILK IND CO LTD

(22)Date of filing : 28.04.1983

(72)Inventor : KUBOYAMA MORIO
HARADA YOSHITSUGU
KAWAJIRI AKIO
TAKAHASHI EIJI

(54) REAGENT FOR DETECTING ANTIGEN

(57)Abstract:

PURPOSE: To detect easily and quickly the antigen in a sample with good reproducibility without receiving the influence of a material which causes a non-specific agglutination by using an antibody for the antigen formed by acylating said antibody and sensitizing the acylated antibody with an insoluble solid as a reagent for agglutination.

CONSTITUTION: An antibody which is acrylated by a succinic anhydride, acetic anhydride, etc. is sensitized with the latex particles of a polystyrene or styrene/ butadiene copolymer. Such sensitized carrier is suspended at 0.01W3.0wt% concn. in a buffer soln. kept at 6W10pH and protein or saccharide which does not contribute to an immune reaction is added thereto as a stabilizer to make the soln. storable. The reagent prepd. in such a way is added to a bio-fluid sample and the antigen is observed with naked eyes by agglutination or the turbidity is observed. The acylated antibody prevents the non-specific agglutination of the protein, etc. in the bio-fluid sample and therefore the need for the operation of removing these disturbing components in the sample is eliminated and the immune analysis is made possible quickly with good reproducibility.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 特許公報(B2)

平2-14661

⑤ Int. Cl.⁵

G 01 N 33/543
33/531

識別記号

F
A

庁内整理番号

7906-2G
7906-2G

⑭ 公告 平成2年(1990)4月9日

発明の数 1 (全9頁)

① 発明の名称 抗原検出用試薬

② 特 願 昭58-74123

③ 公 開 昭59-224565

④ 出 願 昭58(1983)4月28日

⑤ 昭59(1984)12月17日

⑥ 発 明 者 久 保 山 盛 雄 東京都世田谷区代沢1-19-11
⑦ 発 明 者 原 田 義 次 神奈川県横浜市中区本牧緑ヶ丘58
⑧ 発 明 者 川 尻 章 夫 埼玉県富士見市山室2-24-5
⑨ 発 明 者 高 橋 栄 治 千葉県船橋市高根台4-6-322-2
⑩ 出 願 人 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号
⑪ 復 代 理 人 弁理士 荻 上 豊 規 外1名
審 査 官 秋 月 美 紀 子

1

2

⑦ 特許請求の範囲

1 免疫学的凝集又は凝集阻止反応による体液中又は尿中の抗原の測定に使用するための試薬であつて、抗体を微粒子担体に吸着した感作担体を有効成分とする試薬において、抗体がアシル化剤で化学的に修飾されたものであることを特徴とする抗原検出用試薬。

2 感作担体が0.01~3.0% (重量) の濃度で緩衝液に懸濁されていることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の試薬。

3 緩衝液のpHが6~10であることを特徴とする特許請求の範囲第1項または第2項に記載の試薬。

4 免疫反応に関与しない蛋白質又は糖類を安定剤として含有することを特徴とする特許請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかに記載の試薬。

発明の詳細な説明

本発明はアシル化剤で化学的に修飾した抗体(以下アシル化抗体と記載する)を微粒子担体に吸着した感作担体を主成分とする抗原検出用試薬に関する。

〔従来の背景及び先行技術〕

現在、体液中又は尿中の各種ホルモン、蛋白質、薬物及びこれらの代謝産物等の検出あるいはこれらの濃度の測定(いわゆる臨床分析)が疾患

の診断、予後の判定及び治療法の決定等に重要な役割を演じている。そしてこれらの測定は、物理化学的、生化学的あるいは免疫学的方法でなされているが、免疫学的方法によるラジオイムノアッセイ(Radioimmunoassay) (RIA)、エンザイムイムノアッセイ(Enzyme immunoassay) (EIA)等は、体液中又は尿中の微量成分を特異的かつ再現性よく測定出来るので臨床分析の分野で広く使用され、免疫学的凝集あるいは凝集阻止反応による体液中又は尿中の微量成分の検出法も広く実用に供されている。

この凝集あるいは凝集阻止反応による検出法は、例えば、抗原を哺乳動物に免疫して抗原に特異的な抗体を産生させ、抗原及び/又は抗体を微粒子担体(例えば、赤血球、ラテックス等)に吸着させ、抗体又は抗原と反応させ、凝集阻止又は凝集の状態を肉眼又は機械で観察又は測定することによつて、抗原の有無又は抗原の濃度を知ることが出来る。

このような担体を利用した凝集又は凝集阻止反応により、体液中又は尿中の抗原を検出する測定方法によつて最も影響を及ぼすのは体液中又は尿中に存在する物質による非特異的凝集(免疫学的は抗原抗体反応に基づく特異的な凝集以外の凝集をいう)であり、一般的には「非特異的凝集反

応」と呼ばれている。非特異的凝集反応は、特に担体に抗体を吸着させて、試料中の抗原との凝集反応によって感作担体の凝集の有無の判定又は抗原の濃度の測定をする際に、非常に大きな問題となる。即ち非特異的凝集が生じた場合、体液中又は尿中の抗原が本来存在していないのに存在すると誤って判断され、あるいは存在量が低いのを高いと判断されることとなり、抗原の有無又は濃度を測定する方法としての精度及び再現性等に信頼性を欠く結果となる。従つて疾患の診断、予後の判定及び治療法の決定等に重大な影響を及ぼすのである。

このような理由から非特異的凝集反応を排除することは、免疫学的凝集又は凝集阻止反応によつて体液中又は尿中の抗原を検出する方法においてはきわめて重要なことであり、非特異的凝集反応を排除するための方法が従来種々試みられている。それらの方法には、使用する試薬の緩衝液の種類及びpHを特定する方法（特開昭57-35754号公報及び特開昭57-182168号公報）非特異的凝集反応をおこす物質等を濾過して除去する方法（特開昭47-31696号公報、特公昭52-43038号公報、特公昭57-24509号公報、特開昭55-146022号公報及び特開昭57-182170号公報）、使用する試薬に特殊な添加物を加える方法（特公昭43-12741号公報、特公昭49-11407号公報、特開昭50-82230号公報、特開昭55-12419号公報、特開昭57-1970号公報、特開昭57-9723号公報及び特開昭57-59167号公報）及び抗体を加水分解酵素で分解する方法（特開昭54-139595号公報）等がある。

これらの従来法からも明らかな如く、非特異的凝集の出現に関する問題が臨床分析の分野における重大な関心事があり、非特異的凝集反応を排除する試みが種々実施されてきたが、非特異的凝集反応を選択的に完全に排除することが困難であるか、選択的な排除出来ても抗体の持つ特異的凝集能が失われるか、抗体の蛋白質構造の一部に関連した部分で認められる例えば、リウマチ因子又は補体等のような原因の明らかにされている非特異的凝集の排除であるか、又は非特異的凝集を排除するために非常に複雑な試薬の調製を必要とするかの難点があり、未だ十分に満足な方法は確立されていない。

一方、アシル化剤により蛋白質を修飾することは従来から広く行なわれ、蛋白質の構造の研究又は熱安定性の改善（特公昭57-29039号公報）のために利用されている。更に抗体を化学的に修飾する方法としては2, 4-ジニトロフェニル基の導入（特開昭54-139595号公報）及びサクシニル化、〔ネイチュア（Nature）、第210巻、第536頁、1966年〕が知られている。前者は抗体を微粒子担体により強固に吸着させることを目的としており、後者はサクシニル化した γ -グロブリンの製法及び性質に関する基礎的研究である。従つて、従来アシル化抗体が免疫学的反応において非特異的凝集の排除に有効であることは知られていない。

本発明者らは、免疫学的凝集反応を利用した体液中又は尿中の抗原を、非特異的凝集反応をおこさず、容易にかつ迅速に測定出来る試薬の開発を鋭意進めた結果、驚くべきことにアシル化抗体で感作した微粒子担体を使用することにより、体液中又は尿中に存在する非特異的凝集反応をおこす物質の影響を全く排除し、試料中の抗原を容易にかつ迅速に精度高く測定出来ることを見出し、本発明を完成した。

〔発明の目的及び発明の要約〕

本発明の目的は、試料中に存在する非特異的凝集反応をおこす物質の影響を全く受けない抗原検出用試薬を提供することにある。

本発明の他の目的は、簡便、迅速かつ再現性良好に体液中又は尿中の抗原を測定するための試薬を提供することにある。

本発明は、免疫学的凝集又は凝集阻止反応による体液中又は尿中の抗原の測定に使用するための試薬であつて、抗体を微粒子担体に吸着した感作担体を有効成分とする試薬において、抗体がアシル化剤で化学的に修飾されたものであることを特徴とする抗原検出用試薬である。

〔発明の具体的な説明〕

本発明に使用する抗体は、抗原と反応させた降、抗原抗体反応沈降物を形成するいわゆる高分子の抗原（蛋白質、ポリペプチド、多糖類、脂質等）又は抗原と反応させた際抗原抗体反応はおこるが抗原抗体反応沈降物は形成しない、いわゆる低分子の抗原（ステロイド、薬物等のハプテン）を常法によりモルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツ

ジ、ウマ等（好ましくはウサギ、ヤギ、ヒツジ）に免疫し、産生させたものであり、抗原の種類は問わない。このようにして産生された抗体はそれぞれの抗原に対する特異抗体を含有する抗血清として免疫動物から得られるが、この抗血清をそのままでも本発明に使用することが出来る。又、動物血清中には生物学的活性を有する各種の物質が含まれているので、抗体が含まれている免疫グロブリンを常法により分離するか、あるいは常法によつて更に精製した特異抗体そのものを利用することも出来る。

免疫グロブリンの分離法にはすでに各種の方法が確立されているが、硫酸分画及びDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーあるいは兩者の併用が一般的である。又、特異抗体を精製するには現在ではアフィニティークロマトグラフィーが利用されているが、この方法によつて精製した抗体も使用可能である。

本発明では前記の如くして得られた抗体を次のように常法によりアシル化剤を使用して化学的に修飾する。即ち抗体を水又は緩衝液に溶解し、pH 7～10に調整し、抗体蛋白質重量の0.2～200%（重量。以下同じ）、好ましくは0.5%～100%のアシル化剤を攪拌しながら徐々に添加し、この間アルカリ溶液の適当量を適宜添加することによりpHを6～10、好ましくは7～9に維持し、アシル化剤添加終了後この溶液を蒸留水、塩溶液又は緩衝液に対して透析し、不要なアシル化剤を除去し、アシル化抗体を得る。使用するアシル化剤はどのようなものでもよいが化学的修飾により抗体本来の特異的活性が失われることなく、免疫学的凝集反応における非特異的凝集反応の排除し、アシル化剤による化学的修飾が定量的に進行し、化学的修飾後アシル化の除去が簡単であり、アシル化剤の取り扱いが容易であり、かつ安価であることが望まれる。アシル化剤の具体例としてはモノカルボン酸無水物（例えば無水酢酸、無水エトキシギ酸）、ジカルボン酸無水物（例えば無水コハク酸、無水マレイン酸、無水シトラコン酸、無水テトラフルオロコハク酸、無水3, 3-テトラメチレングルタル酸）その他のポリカルボン酸無水物、これらカルボン酸のハライド、酸エステルがあり、特に好ましいのは無水コハク酸、無水マレイン酸及び無水酢酸である。

抗体をアシル化剤で処理することにより、抗体の蛋白質としての荷電が変化する。例えば、無水酢酸を使用して抗体をアシル化した場合、抗体蛋白質分子中のリジン残基のε-アミノ基がアセチル化され、アミノ基の正荷電が無荷電となる。その結果、抗体蛋白質分子全体の荷電は未処理のそれと比較して若干負側に移行することとなる。又、無水コハク酸を使用して抗体をアシル化した場合、抗体蛋白質分子中のリジン残基のε-アミノ基がサクシニル化され、アミノ基の正荷電がコハク酸の1個のカルボキシルの負荷電に置換され、その結果抗体蛋白質分子全体の荷電は未処理のそれと比較して著しく負側へ移行することとなる。このようなアシル化抗体の荷電の移行は、使用するアシル化剤の種類、濃度及び処理条件等により、それぞれ変動するが、アシル化抗体が非特異的凝集をおこさない至適条件は使用するアシル化剤の種類により、容易に選択することが出来る。

本発明に使用する微粒子担体はラテックス粒子、赤血球、無機化合物等であり、中でもラテックス粒子が望ましい。ラテックス粒子にも種々の種類があるが、反応基がなく、かつ化学的及び血清学的に不活性なポリスチレン、ポリブタジエン、スチレン・ブタジエン共重合体のラテックス粒子が望ましく、特にポリスチレン ラテックス粒子が望ましい。

使用するラテックス粒子の直径は0.05～5μ、特に0.1～2μが望ましい。

次に微粒子担体にアシル化抗体を常法により吸着させる。微粒子担体をpH 6から10の緩衝液に分散し、アシル化抗体を溶解した緩衝液に前記微粒子担体懸濁液を加えて混合し、抗体を微粒子担体に感作する。感作するアシル化抗体の量は、その種類及び目的とする感度等の種々の条件により適宜選択決定すればよい。感作温度は4から70℃、好ましくは25～56℃であり、感作時間は数分ないし数時間であるが好ましくは0.5～3時間である。このようにして得られたアシル化抗体を感作した微粒子担体を遠心分離して沈殿物を分離し、沈殿物そのもの又は沈殿物をpH 6～10の緩衝液に再分散して乾燥し、試薬とすることもできる。この乾燥して得た試薬に直接所定量の試料を添加するか又は使用時に緩衝液に懸濁するかして試料中の抗

原を測定することもできる。

又遠心分離して得られた沈殿物をpH 6～10の緩衝液に再分散し、液状の試薬とすることもできる。液状の試薬の保存及び反応時の安定性を維持するために安定剤を添加してもよい。安定剤として例えば免疫反応に関与しない蛋白質、糖等が用いられ、特に血清アルブミンが好適である。

アシル化抗体を感作した微粒子担体を緩衝液に分散する濃度は通常0.01～3.0%、好ましくは0.05～1.5%である。

以上のようにして本発明の試薬は製造される。本発明の試薬（液状）は次のようにして使用される。体液（血液等）又は尿等の試料（必要に応じ希釈等の前処理を常法により行なつてもよい）の一定量をスライド板上又は試験管に採取し、本発明の試薬の所定量を加え、均一に混合する。そして生じた凝集を肉眼で観察するか又は光学的に測定する。肉眼で観察する場合には、スライド上又は試験管中で抗原を含む体液又は尿の試料を本発明の試薬と混合し、凝集の有無を観察する。又光学的に測定する場合には、試験管中で抗原を含む体液又は尿の試料を本発明の試薬と混合し、常法により光学セル中で光の透過率、散乱光又は濁度の変化を測定する。

乾燥した本発明の試薬は、使用時に緩衝液に懸濁し、前記液状の本発明の試薬と同様に使用され、乾燥した本発明の試薬に直接試料を加える場合には体液（血液等）又は尿等の試料の一定量を乾燥した試薬に加え混合して均一に再分散させ、前記液状の本発明の試薬と同様に凝集の有無を肉眼で観察するか光学的に測定する。次に実施例を記載して本発明を更に詳述する。

実施例 1

(1-1) 抗体（抗HCG免疫グロブリン）の調製高度に精製したヒト絨毛性ゴナドトロピン（以下HCGと記載する）をヤギに免疫して得られた抗HCG血清50mlに硫酸アンモニウムの飽和溶液25mlを加え、氷冷下で20分間攪拌した後、10000r.p.m.で20分間冷却遠心分離を行ない、生じた沈殿を回収した。氷冷下で得られた沈殿を水30mlに溶解し、さらに硫酸アンモニウムの飽和溶液15mlを加え、20分間遠心分離を行ない、生じた沈殿を回収した。同様な操作をさらに2回反復し、最終的に得られた沈殿を0.01M

リン酸緩衝液（pH8.0）に溶解し、あらかじめ同一の緩衝液で平衡化したセファデックスG-25カラムを用いたゲル濾過により免疫グロブリンを分別し、得られた免疫グロブリン分画を凍結乾燥し、抗HCG免疫グロブリン約500mgを得た。

(1-2) 抗体（抗HCG免疫グロブリン）のアシル化

前記（1-1）で得られた抗HCG免疫グロブリン200mgをNaOH添加0.1M NaCl溶液（pH 8）に1%の濃度で溶解し、氷水中で冷却した。この溶液を攪拌しながら無水コハク酸の粉末40mgを徐々に添加し、溶液のpHの低下防止のために1N NaOHを添加しながらpHを7以上に維持し、無水コハク酸を溶解した後さらに1時間攪拌を継続した。反応終了後この混合液をNaOH添加0.1M NaCl溶液（pH8.5）に対して一晩透析して未反応のコハク酸を除去し、サクシニル化抗HCG免疫グロブリン約202mgを得た。

(1-3) アシル化抗体（サクシニル化抗HCG免疫グロブリン）感作微粒子担体の製造

前記（1-2）で得られたサクシニル化抗HCG免疫グロブリンをグリシン緩衝液（pH 8.2）に1mg/mlの濃度に溶解し、この溶液1容と、粒子径0.220μmのポリスチレンラテックス粒子（ダウケミカル社製）を2%の濃度でグリシン緩衝液（pH8.2）に分散した液1容とを混合し、37℃で1時間保持し、サクシニル化抗HCG免疫グロブリンをポリスチレンラテックス粒子に吸着させた。次いで感作ラテックスを10000r.p.m.で20分間遠心分離し、未吸着サクシニル化抗HCG免疫グロブリンを除去し、沈殿した感作ラテックスを集め、サクシニル化抗HCG免疫グロブリン感作微粒子担体約2.5gを得た。

(1-4) 抗原検出用試薬の製造

前記（1-3）で得られたサクシニル化抗HCG免疫グロブリン感作ラテックス1gを、安定剤として0.1%のウサギ血清アルブミン（以下RSAと記載する）を含むグリシン緩衝液（pH8.2）100mlに再懸濁しサクシニル化抗HCG免疫グロブリン感作ラテックス試薬を得た。

(1-5) 標準HCG溶液による感度測定

以上のようにして得られたサクシニル化抗

HCG免疫グロブリン感作ラテックス試薬の感度を次の方法により測定した。表1に示す濃度で標準HCGを0.1%RSA含有グリシン緩衝液(pH8.2)に溶解した液50 μ l、該緩衝液25 μ l及びサクシニル化抗HCG免疫グロブリン感作ラテックス試薬25 μ lをそれぞれスライドガラス上に滴下し、混合した。次いで3分間緩徐にスライドガラスを揺動させて凝集の有無を肉眼で観察した。なお対照としての従来法はサクシニル化抗HCG免疫グロブリンの代りに前記(1-1)で得られ抗HCG免疫グロブリンを用いて同様に製造した抗HCG免疫グロブリン感作ラテックス試薬を用いた。その結果は表1に示すとおりであった。

表 1

標準HCG溶液 (IU/ml)	肉眼的観察	
	本発明の試薬	従来法による試薬
0.1	—	—
0.25	—	—
0.5	—	—
1.0	+	+
2.5	+	+
5.0	+	+

註 十：凝集 有、—：凝集 無

表1から明らかなように、本発明の試薬と従来法のそれとは同一の検出感度(1IU/ml)を有し、抗HCG免疫グロブリンのサクシニル化による検出感度への影響は認められなかった。

(1-6) 非妊婦尿による非特異的凝集反応 出現の有無の測定

非妊婦尿20試料を遠心分離して沈殿物を除いた原尿50 μ lをスライドガラス上に滴下し、以下前記(1-5)と同一の操作に従って凝集の有無を肉眼で観察した。対照としての従来法による試薬は前記(1-5)と同一の試薬を用いた。その結果は表2に示すとおりであった。

表 2

試料No	本発明の試薬	従来法による試薬
1	—	+
2	—	+

試料No	本発明の試薬	従来法による試薬
3	—	+
4	—	+
5	—	±
6	—	+
7	—	+
8	—	+
9	—	+
10	—	+
11	—	+
12	—	+
13	—	+
14	—	+
15	—	+
16	—	+
17	—	±
18	—	+
19	—	+
20	—	+

註 十：凝集 有、±：弱い凝集 有、—：凝集 無

表2から明らかなように、非妊婦尿において本発明の試薬は非特異的凝集が1例も認められなかったのに対し、従来法による試薬においてはすべての検体において凝集又は弱い凝集が認められた。このことは従来法による試薬ではいずれの試料でも非特異的凝集が生じ、試料中のHCGを正確に検出できないことを示している。

(1-7) 妊婦尿による尿中HCGの測定

初期妊婦尿20試料を前記(1-6)と同一の操作で測定した。尚、比較のため尿中HCG濃度を Ratky らの RIA(British Journal of Haematology、30巻、145頁、1975年)によって測定した。その結果は表3に示すとおりであった。

表 3

試料No	本発明の試薬	従来法による試薬	RIA (IU/ml)
1	+	+	8.4
2	+	+	2.1
3	+	+	3.5

試料No.	本発明 の試薬	従来法に よる試薬	RIA (IU/ml)
4	—	+	0.7
5	+	+	5.2
6	—	+	0.5
7	+	+	1.6
8	+	+	2.2
9	+	+	6.6
10	+	+	2.0
11	+	+	4.6
12	+	+	3.1
13	—	+	0.4
14	±	+	1.1
15	+	+	3.5
16	+	+	8.7
17	—	+	0.5
18	—	+	0.7
19	+	+	2.1
20	+	+	4.3

⊕：凝集 有、±：弱い凝集
有、—：凝集 無

本発明の試薬においてはHCGの検出限度が
1IU/mlに設定されているので初期妊婦尿中の
HCG濃度が本発明の試薬の検出感度以下であ
る5試料(No.4、6、13、17及び18)では凝集
が認められず、RIAによる測定結果と一致して
いたが、従来法による試薬では検出感度以下の
試料でもすべて凝集が認められ、RIAによる測
定結果と一致しなかった。

実施例 2

(2-1) 抗体(抗エストリオール-16α-グルクロ ナイド免疫グロブリン)の調製

エストリオール-16α-グルクロナイド(以
下E3-16αGと記載する)と牛血清アルブミン
(以下BSAと記載する)を常法により化学的に
結合させて得たE3-16αG-BSA複合物を家兎
に免疫し、得られた抗E3-16αG-BSA血清50
mlを0.01Mリン酸緩衝液(pH8.0)に10ℓに1
晩透析した。BSAに抗BSA抗体を吸収させ、
この溶液をあらかじめ上記緩衝液で平衡化した
DEAEセルロースを用いたクロマトグラフィー
により免疫グロブリン分画を回収し、抗E3-
16αG免疫グロブリン約250mgを得た。

(2-2) 抗体のアシル化

前記(2-1)で得られた抗E3-16αG免疫
グロブリン100mgを0.1M NaCl(pH 9)に1%
濃度に溶解し、氷水中で冷却し、溶液を攪拌し
ながら無水マレイン酸の粉末5mgを徐々に添加
し、pHの低下を防止するために0.5N NaOHを
添加しなららpHを7以上に維持し、無水マレ
イン酸を溶解後さらに1時間攪拌を継続した。反
応終了後混合物をpH0.5に調整した蒸留水に対
して透析し、未反応のマレイン酸を除去した後
凍結乾燥し、マレイル化抗E3-16αG免疫グロ
ブリン約98mgを得た。

(2-3) マレイル化抗E3-16αG免疫グロブリン感 作ラテックスの製造

前記(2-2)で得られたマレイル化抗E3
-16αG免疫グロブリンをバルビタール緩衝液
(pH7.8)に1mg/mlの濃度で溶解した溶液1容
と、粒子径0.198μmのポリスチレンラテックス粒
子(ダウケミカル社製)を2%の濃度でバルビ
タール緩衝液(pH7.8)に分散した液1容とを
混合し、45℃で1時間保持しマレイル化抗E3
-16αG免疫グロブリンをポリスチレンラテッ
クス粒子に吸着させた。次いで感作ラテックス
を10000r.p.m.20分間遠心分離し、未吸着のマ
レイル化抗E3-16αG免疫グロブリンを除去
し、沈殿したマレイル化抗E3-16αG免疫グロ
ブリン感作ラテックス約1.5gを得た。

(2-4) 抗原検出用試薬の製造

前記(2-3)で得られたマレイル化抗E3
-16αG免疫グロブリン感作ラテックス0.5g
を、安定剤として0.1%のRSAを含むバルビ
タール緩衝液(pH7.8)100mlに再懸濁し、マレ
イル化抗E3-16αG免疫グロブリン感作ラテッ
クス試薬を得た。

(2-5) E3-16αG-RSA感作ラテックス試薬の製 造

E3-16αGとRSAを特開昭54-8715号公報記
載の実施例1の方法に基づいてE3-16αGが
RSA1分子当り2個結合しているE3-16αG-
RSAを合成した。このE3-16αG-RSAを前記
(2-4)と同一の方法により、E3-16αG-
RSA感作ラテックス試薬を得た。得られた試
薬のE3-16αGの検出感度を0.2μg/mlに調整
した。

(2-6) 標準E3-16αG溶液による感度設定

前記(2-4)及び(2-5)で得られた2種類の試薬により凝集阻止感度を測定した。表4に示す標準E3-16αGのバルビタール緩衝液(pH7.8) 50μℓと前記(2-5)で得られた感作試薬20μℓとをスライドガラス上に滴下し、混合した。前記(2-4)で得られた本発明の試薬20μℓを混合液中に滴下し、3分間緩徐に揺動させて凝集の有無を肉眼で観察した。なお対照の従来法による試薬としては、マレイル化抗E3-16αG免疫グロブリンの代りに前記(2-1)で得られた抗E3-16αG免疫グロブリンを用い、前記(2-3)及び(2-4)と同一の方法により抗E3-16αG免疫グロブリン感作ラテックス試薬を製造し、上記と同様の操作で凝集の有無を肉眼で観察した。その結果は表4に示すとおりであった。

表 4

標準E3-16αG溶液 (μg/ml)	本発明 の試薬	従来法に よる試薬
0.05	+	+
0.1	+	+
0.2	-	-
0.5	-	-
1.0	-	-

注: +:凝集 有、-:凝集 無

表4から明らかなように本発明の試薬と従来のそれとは同一の検出感度(0.2μg/ml)を有し、抗E3-16αG免疫グロブリンのマレイル化による検出感度への影響は認められなかった。

(2-7) 尿中E3-16αGの測定

初期妊婦尿10試料を前記(2-6)と同様の操作で測定した。尚比較のため尿中E3-16αG濃度を StanczkらのRIA(Journal of steroid Biochemistry, 10巻、443頁、1979年)によつて測定した。その結果は表5に示すとおりであった。

表 5

試料No	本発明 の試薬	従来法に よる試薬	RIA (IU/ml)
1	+	+	0.20
2	-	+	0.60

試料No	本発明 の試薬	従来法に よる試薬	RIA (IU/ml)
3	-	+	0.34
4	-	+	1.10
5	+	+	0.08
6	-	+	0.24
7	+	+	0.02
8	-	+	0.27
9	-	+	0.61
10	+	+	0.14

注: +:凝集 有、-:凝集 無

本発明の試薬においてはE3-16αGの検出感度が0.2μg/mlに設定されているので初期妊婦尿中のE3-16αG濃度が本発明の試薬の検出感度以下である4試料(No 1、5、7及び10)では凝集が認められ、RIAによる測定結果と一致していたが、従来法による試薬では検出感度以上の試料でもすべて凝集が認められ、全試料とも検出感度以下の濃度と判定され、RIAによる測定結果と一致しなかった。

実施例 3

(3-1) 抗体(抗ヒトフィブリノーゲン免疫グロブリン)の調製

高度に精製したヒトフィブリノーゲン(以下Fgと記載する)を家兎に免疫して得られた抗Fg血清10mlを、常法により調製したFg-セファロース4Bを充填したカラムに通夜した。次いで0.01Mリン酸緩衝液(pH8.0)を通夜してカラムを洗浄し、抗Fg免疫グロブリン以外の不要物を除去した。次いで0.2Mグリシン-塩酸緩衝液(pH:2.3)で抗Fg免疫グロブリンを溶出させ、溶出液のpHを7~8に保持した。最終的に溶出液のpHを7.5に調整した後、凍結乾燥した。この調製法を反復して実施し、抗Fg免疫グロブリン約50mgを得た。

(3-2) 抗体のアシル化

前記(3-1)で得られた抗Fg免疫グロブリン50mgを0.5%の濃度で水に溶解し、氷水中で冷却しながら6gの酢酸ナトリウムの粉末を加え完全に溶解し、攪拌及び冷却を続けながら無水酢酸25μℓを緩徐に添加し、添加終了後更に1時間反応を継続した。反応終了後、溶液を0.1MのNaClを含むグリシン緩衝液(pH8.2)に

対して一晚透析し、酢酸を除去し、アセチル化抗Fg免疫グロブリン約45mgを得た。

(3-3) アセチル化抗Fg免疫グロブリン感作ラテックス試薬の製造

前記(3-2)で得られたアセチル化抗Fg免疫グロブリンをグリシン緩衝液(pH8.6)に0.3mg/mlの濃度で溶解した溶液1容と、粒子径0.721 μ のポリスチレンラテックス粒子(ダウケミカル社製)を2%の濃度でグリシン緩衝液(pH8.6)に懸濁した液1容とを混合し、以下実施例1と同様の操作でアセチル化抗Fg免疫グロブリン感作ラテックス1.2%を含む本発明の試薬的80mlを得た。

(3-4) 標準Fg溶液による感度測定

前記(3-3)で得られた本発明の試薬の感度を測定した。本発明の試薬25 μ lと表6に示す標準Fg溶液(0.2%ウサギ血清アルブミンを含有するグリシン緩衝液(pH8.6)に溶解)75 μ lをスライドグラス上に滴下し、以下実施例1(1-5)と同様の操作で凝集の有無を肉眼で観察した。なお対照の従来法による試薬としてはアセチル化抗Fg免疫グロブリンの代りに前記(3-1)で得た抗Fg免疫グロブリンを用いて、前記(3-3)と同様に抗Fg免疫グロブリン感作ラテックス試薬を調製し、上記と同様の操作で、凝集の有無を肉眼で観察した。その結果は表6に示すとおりであった。

表 6

標準Fg溶液 (μ g/ml)	本発明の試薬	従来法による試薬
0.1	—	—
0.25	—	—
0.5	+	+
1	+	+
2	+	+
5	+	+
10	+	+

注: +:凝集 有、—:凝集 無

表6から明らかなように、本発明の試薬と従来法によるそれとは同一の検出感度(0.5 μ g/ml)を有し、抗Fg免疫グロブリンのアセチル化による検出感度への影響は認められなかった。

(3-5) 健康男子尿による非特異的凝集反応出現の有無の測定

健康男子尿10試料を原尿のまま75 μ lスライド上に滴下し、次いで前記(3-3)で得た本発明の試薬25 μ lを滴下して3分間緩徐にスライドグラスを揺動させて凝集の有無を肉眼で観察した。なお従来法による試薬には前記(3-4)と同一のものをを用い、同様に凝集の有無を観察した。その結果は表7に示すとおりであった。

表 7

試料No	本発明の試薬	従来法による試薬
1	—	+
2	—	+
3	—	+
4	—	+
5	—	+
6	—	+
7	—	+
8	—	+
9	—	+
10	—	+

注: +:凝集 有、—:凝集 無

本発明の試料では非特異的凝集が1例も認められなかったのに対し、従来法による試薬においては全試料に非特異的凝集が認められた。

(3-6) 尿中フィブリン又はそれらの分解産物(以下FDRと記載する)の測定

血管内凝固症候群を疑われる10名から採取した尿を試料として前記(3-5)と同一の操作法に従って尿中FDPを測定した。なお比較のため尿中FDP濃度を前記RatkyらのRIAによって測定した。その結果は表8に示すとおりであった。

表 8

試料No	本発明の試薬	従来法による試薬	RIA (IU/ml)
1	+	+	2.1
2	+	+	0.33
3	+	+	0.63
4	—	+	0.21
5	—	+	0.13

試料No	本発明 の試薬	従来法に よる試薬	RIA (IU/ml)
6	+	+	1.60
7	-	+	0.15
8	+	+	8.3
9	-	+	0.10
10	-	+	0.17

注 十：凝集 有、一：凝集 無

本発明の試薬においては、試料中のFDP濃度が本感作ラテックス試薬の検出感度以下である5試料（No 4、5、7、9及び10）では凝集が認められず、RIAによる測定結果と一致していたが、従来法による試薬では検出感度以下の

試料でもすべて凝集が認められ、RIAによる測定結果と一致しなかった。

〔発明の効果〕

本発明によつて奏せられる効果は次のとおりで

5 ある。

(1) 試料中の非特異的な凝集を惹起する物質による影響を全く受けずに抗原を測定できる。

(2) 試料中の抗原測定結果の再現性が極めてすぐれている。

10 (3) 採取直後の新鮮な試料については、試料の一切の前処理をすることなく、試料中の抗原を測定できる。

(4) 試薬の調製が極めて簡便である。